

Applications biomédicales de l'électrophorèse capillaire

Marc G.J. Feuilloley, Annabelle Merieau, Nicole Orange

L'électrophorèse capillaire est une des principales microtechniques en émergence destinée à l'analyse qualitative et quantitative de solutions complexes à partir d'échantillons de très faible volume. Dans cette technique, les molécules à analyser sont injectées dans un capillaire de faible diamètre interne rempli d'un tampon, éventuellement d'un gel de silice greffé, au sein duquel la séparation des molécules est réalisée sous l'action d'un potentiel électrique pouvant atteindre 500 Volts/cm. L'application d'un tel champ électrique, rendu possible par le très faible diamètre du capillaire qui permet une dissipation optimale de la chaleur engendrée par l'effet Joule, conduit à une séparation rapide, sous des efficacités jusqu'à présent

rarement égalées, de molécules organiques sur une gamme très importante de masse moléculaire et correspondant à des structures aussi variées que des sucres, des lipides, des peptides, des protéines ou des ions. L'électrophorèse capillaire est aussi sur le point de pouvoir supplanter les techniques classiques d'étude de liaison et de dosage immunologique. Toutefois, c'est dans ses développements récents que se trouvent les aspects les plus novateurs de cette technique avec son application à l'analyse directe de l'activité sécrétrice et du contenu d'une cellule vivante, donnant naissance à l'électrophorèse capillaire sur cellule unique qui peut être définie comme une forme originale de patch-clamp chimique.

Les techniques électrophorétiques font classiquement appel à un support solide (papier, acétate de cellulose, gel de polyacrylamide...). Pourtant, l'électrophorèse avait été décrite à l'origine sous une forme libre de tout support, l'électrophorèse en veine, mais cette technique aux performances médiocres avait été rapidement supplantée. Ce n'est que dans les années 1970 à 1980 que plusieurs équipes reprenant cette approche montrèrent qu'il est possible de réaliser une séparation électrophorétique en veine liquide sans adjonction d'agent stabilisant, en utilisant un tube de faible diamètre interne (< 200 µm) [1]. Dans ces conditions, le matériau constituant le capillaire revêt une importance capitale, en particulier du fait du risque d'interaction de l'échantillon avec la paroi interne du tube. Cela est d'autant plus vrai que, depuis ces

premiers essais, le diamètre interne des capillaires a été réduit à quelques dizaines de micromètres, voire moins, afin de permettre l'emploi de champs électriques intenses sans induire d'échauffement par effet Joule.

Principe et variantes de l'électrophorèse capillaire

Classiquement, le capillaire d'électrophorèse est composé de silice fondue et est recouvert d'une gaine de polymère qui lui assure flexibilité et résistance. Dans la forme la plus simple d'électrophorèse capillaire, l'électrophorèse capillaire de zone libre (CZE) (figure 1), le capillaire de silice fondue, d'une longueur de quelques centimètres à 1 mètre, est rempli d'un tampon aqueux et l'échantillon est introduit à une extrémité, en général l'anode. Cet échantillon,

d'un volume de 2 à 30 nanolitres, est injecté soit par l'apposition d'un bref champ électrique intense (électro-injection), soit plus fréquemment par une surpression d'azote (injection hydrodynamique). Contrairement à l'HPLC (*high performance liquid chromatography*) dans laquelle les molécules sont entraînées par pompage d'une phase mobile, causant ainsi des pertes de charge considérables, le déplacement des molécules est ici assuré par un flux qui prend naissance au sein même du tampon. En présence d'un tampon aqueux de pH > 1,5 les groupes silanol de la paroi du capillaire sont chargés négativement. Ces charges attirent les cations du tampon, créant une double couche, dite double couche de Stern, composée d'une couche interne de cations du tampon liés aux silanols de la paroi du capillaire et d'une couche diffuse qui présente un excédent en cations. Sous

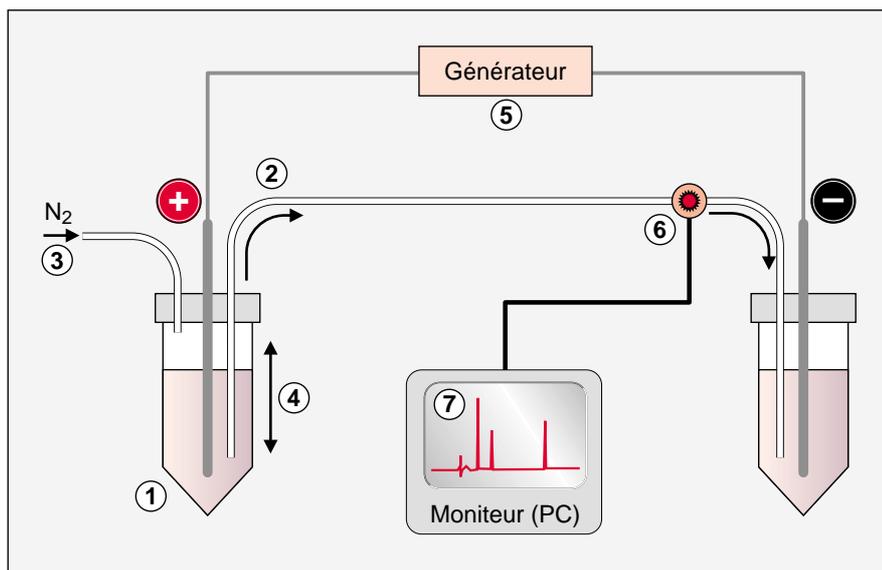


Figure 1. **Schéma d'un appareil d'électrophorèse capillaire de zone libre (CZE).** Quelques nanolitres d'échantillon (1) sont injectés dans le capillaire (2) par une surpression d'azote (3). Le tube échantillon est alors substitué par un tube contenant le tampon d'électrophorèse (4). Le générateur (5) est immédiatement mis en marche afin d'imposer un champ électrique de l'ordre de 500 volts/cm entre les deux extrémités du capillaire. Un détecteur (6) enregistre le passage des molécules séparées au cours de l'électrophorèse et transmet cette information à un ordinateur (7) au niveau duquel est construit un graphe (électrophérogramme) représentant la variation de densité optique ou de fluorescence en fonction du temps.

l'effet du champ électrique imposé entre les deux extrémités du capillaire, les cations excédentaires de la couche diffuse se mettent en mouvement en direction de l'extrémité négative du capillaire (cathode) entraînant avec eux l'ensemble des molécules du solvant. Il se crée donc un flux de tampon désigné sous le terme de flux électro-osmotique (FEO). Ce FEO assure un pompage des molécules de l'anode vers la cathode sous la forme d'un front plat, contrairement au profil parabolique observé en HPLC, induisant ainsi une très faible dispersion de la bande échantillon et une efficacité séparative élevée. Dans ce FEO, les molécules de l'échantillon auront des comportements différents selon leur charge et leur taille. Les molécules chargées positivement verront leur mobilité électrophorétique propre (μ_{ep}) s'ajouter au flux électro-osmotique de mobilité (μ_{eo}) et atteindront rapidement l'extrémité cathodique du capillaire, après être passées

devant un détecteur (UV, visible, fluorescence...) situé quelques centimètres en amont. Au contraire, les molécules chargées négativement auront une mobilité électrophorétique μ_{ep} opposée au FEO et tendront à se déplacer vers l'anode. Toutefois, μ_{eo} étant en général supérieur en valeur absolue à μ_{ep} , toutes les molécules finiront par rejoindre l'extrémité cathodique du capillaire et seront détectées. Dans ces conditions les molécules les moins chargées négativement par rapport à leur masse seront éluées en premier tandis que les molécules présentant une forte charge négative verront leur élution retardée (figure 2).

Contrairement à l'HPLC qui repose sur une interaction soluté-matrice chromatographique, la séparation en CZE s'appuie sur le fait que le soluté n'aura pas d'interaction majeure avec la paroi du capillaire. Il en résulte des temps d'analyse très courts, de l'ordre de 5 à 15 min et une quasi absence de risque de

contamination inter-analyse par rétention d'un composé. De même, un changement de tampon en CZE ne nécessite que quelques minutes d'équilibration contre plusieurs heures en HPLC. A ces avantages techniques s'ajoute le fait que le pouvoir séparateur de la CZE atteint couramment les 500 000 plateaux théoriques au mètre et dépasse parfois le million [2], contre 10 000 à 50 000 pour l'HPLC, tout en conservant une reproductibilité de 0,2 % à 2 % comparable à celle de l'HPLC. La limite de la CZE comme celle des autres techniques d'électrophorèse capillaire se situe au niveau de la détection, qui est réalisée le plus fréquemment par absorbance ou par fluorescence induite par laser sur un trajet optique limité correspondant au diamètre interne du capillaire. Toutefois, grâce aux progrès réalisés ces dernières années au niveau de la sensibilité des détecteurs, il est couramment possible d'identifier des molécules présentes à des concentrations picomolaires (10^{-12} mole/l), voire par fluorimétrie induite par laser, d'atteindre une sensibilité de l'ordre de l'attomole (10^{-18} mole/l) [3].

En dépit de ses énormes avantages, la CZE est, de par son principe, inapplicable à la séparation de molécules non chargées ou hydrophobes. Cela a conduit au développement de la chromatographie micellaire électrocinétique capillaire (MEKC) [4]. Dans cette technique, un tensio-actif ionique, tel que le sodium dodécyl sulfate (SDS), est ajouté au tampon à une concentration supérieure à sa concentration micellaire critique. Le tensio-actif forme dans le tampon des micelles à cœur hydrophobe et de surface chargée, négativement dans le cas le plus fréquent de l'utilisation d'un surfactant anionique tel que le SDS. Ainsi, la mobilité de ces micelles est de direction opposée à celle du FEO (figure 3). Si une molécule neutre n'interagit pas avec les micelles, elle reste dans le tampon et est transportée à la vitesse du FEO. Plus la molécule a un caractère hydrophobe, plus elle interagit avec les micelles. Compte tenu que ces micelles ont tendance à migrer dans le sens opposé du FEO, ces molé-

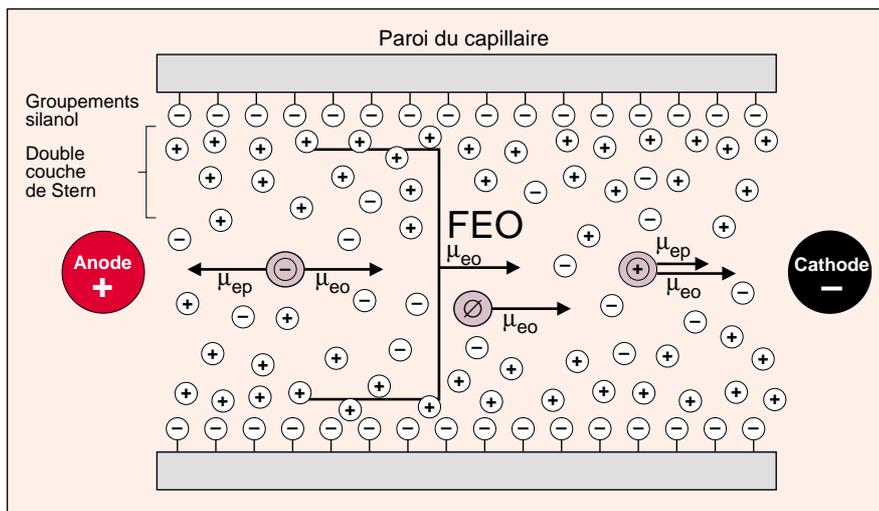


Figure 2. Principe de séparation des molécules en électrophorèse capillaire de zone libre (CZE). Dans un capillaire de silice fondue non traité et en présence d'un tampon de pH > 1,5 les groupements silanol de la paroi du capillaire ont une charge négative qui attire les cations du tampon créant une double couche électrique, dite double couche de Stern. Sous l'effet du champ électrique, les cations excédentaires de la double couche se mettent en mouvement en direction de la cathode et, en entraînant l'ensemble des molécules du solvant, donnent naissance à un flux électro-osmotique (FEO) caractérisé par une mobilité électrophorétique μ_{eo} . D'autre part, les molécules chargées présentes dans l'échantillon ont une mobilité électrophorétique propre μ_{ep} déterminée par leur rapport charge/taille. Une molécule chargée positivement aura une mobilité apparente égale à la somme de μ_{ep} et μ_{eo} et se déplacera plus vite que le FEO. Au contraire, pour une molécule chargée négativement μ_{ep} tendra à s'opposer μ_{eo} . La vitesse de déplacement de cette molécule sera donc inférieure à celle du FEO. En ce qui concerne les molécules neutres, elles ont une valeur de μ_{ep} nulle et se déplaceront toutes à la vitesse du FEO sans être séparées.

cules voient leur élution retardée. Comme dans le cas de la phase inverse en HPLC, les molécules sont donc séparées en fonction de leur coefficient de partage entre les phases hydrophile et hydrophobe. La MEKC présente des performances en terme d'efficacité très proches de celles de la CZE. Ainsi cette technique apparaît comme une alternative de choix pour l'analyse de molécules neutres, voire pour des mélanges de molécules présentant des caractéristiques physico-chimiques très différentes telles que les acides aminés.

D'autres variantes de l'électrophorèse capillaire ont été développées sur la base, soit de techniques électrophorétiques classiques, telles que l'iso-électro-focalisation capillaire (CIEF) directement dérivée de la technique d'isofocalisation [5] ou l'électrophorèse capillaire en gel

(CGE) [6] qui est une version optimisée de l'électrophorèse en gel, soit en tentant de combiner les avantages de techniques chromatographiques avec celles de l'électrophorèse capillaire comme dans le cas de l'électrophorèse capillaire d'affinité (ACE) [7] ou de l'électro-chromatographie capillaire (CEC) [8]. L'ACE associe les propriétés de la chromatographie d'affinité avec celles de la CZE. L'interaction ligand-récepteur est réalisée directement dans la veine liquide permettant de déterminer en un temps limité et avec une précision inégalée les constantes physico-chimiques de cette liaison. La CEC est une technique hybride dans laquelle le capillaire est rempli de particules de silice greffées par des chaînes carbonées en C18, comme dans une colonne d'HPLC en phase inverse, tandis que comme en CZE, le pompage du tampon est assuré par un

FEO induit par un champ électrique. La séparation des molécules repose donc à la fois sur leur caractère hydrophobe et sur leur mobilité électrophorétique. Le pompage du tampon par le FEO assure un front électrophorétique plat ce qui confère à la CEC une efficacité bien supérieure à celle de l'HPLC. En revanche, faisant appel à une phase hydrophobe fixe, la CEC perd la souplesse d'utilisation qui caractérise la CZE.

La forme la plus originale de l'électrophorèse capillaire, et aussi la plus spécifiquement dédiée à la biologie, est l'électrophorèse capillaire sur cellule unique (SC-CE) qui permet, grâce à sa forte miniaturisation et à l'utilisation d'un tampon de séparation qui est aussi un tampon de survie, d'étudier la cinétique de réactions chimiques au sein d'une cellule vivante, voire de mesurer l'activité exocytotique au niveau unitaire [11]. Ainsi, avec deux autres techniques, l'isotachophorèse (ITP), fondée sur l'utilisation de tampons de mobilité électrophorétique variables [9] et l'électrophorèse capillaire en milieu non aqueux (NACE) dont les applications biologiques restent limitées [10], on peut estimer à neuf les différentes formes de l'électrophorèse capillaire (Tableau I).

Application à l'analyse de molécules endogènes

Dès ses débuts, la CZE fut appliquée à la séparation de l'albumine et des globulines sériques et montra sa supériorité par rapport à la technique classique d'électrophorèse en gel d'agarose tant en ce qui concerne la vitesse que la précision ou l'aspect quantitatif de l'analyse [12]. En effet, contrairement aux densitogrammes de gels d'agarose, les pics détectés en CZE sont proportionnels à la concentration en molécules sur une large gamme de valeurs. Cette technique a ainsi été étendue à l'étude des immunoglobulines plasmatiques ainsi qu'à l'identification de variants de l'hémoglobine et à l'analyse d'isoenzymes ne différant parfois que de 0,005 unités au niveau de leur pHi [13]. La récente apparition d'appareils disposant de plusieurs capillaires fonctionnant en parallèle et capables de trai-

Tableau I
LES DIFFÉRENTES FORMES DE L'ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

Forme	Sigle	Milieu d'électrophorèse	Support	Application analytique	
1	Électrophorèse capillaire de zone libre	CZE	Tampon aqueux	Aucun	Molécules chargées
2	Chromatographie micellaire électrocinétique capillaire	MEKC	Tampon aqueux + tensio-actif	Aucun	Molécules hydrophobes
3	Iso-électro-focalisation capillaire	CIEF	Tampon aqueux + Gradient de pH	Aucun	Molécules chargées
4	Électrophorèse capillaire en gel	CGE	Tampon aqueux	Gel de polyacrylamide	Molécules chargées
5	Électrophorèse capillaire d'affinité	ACE	Tampon aqueux + récepteur ou ligand	Aucun	Études de liaison dosage immunologique
6	Électro-chromatographie capillaire	CEC	Tampon aqueux	Gel de silice	Molécules chargées et hydrophobes
7	Isotachophorèse	ITP	Tamppons de mobilité électrophorétique variable	Aucun	Molécules chargées (protéines)
8	Électrophorèse capillaire en milieux non aqueux	NACE	Solvant + ions	Aucun	Molécules hydrophobes
9	Électrophorèse capillaire sur cellule unique	SC-CE	Milieux de survie cellulaire	Aucun (une cellule vivante)	Métabolites hydrophiles

ter plus de 40 échantillons par heure a permis l'automatisation de la plupart de ces analyses et leur application en routine. Des progrès significatifs ont aussi été réalisés en ce qui concerne l'application expérimentale de l'électrophorèse capillaire à l'analyse de peptides et de protéines, avec en particulier le couplage de la CZE à la spectrométrie de masse en électrospray (CZE-MS). La CZE-MS permet de s'affranchir des problèmes de détection qui constituent la principale limite actuelle de l'électrophorèse capillaire. Ainsi, il a été possible d'analyser, à partir de plasma brut, des protéines de 8 à 29 kDa présentes à des concentrations attomolaires et de déterminer leur masse moléculaire avec une erreur inférieure au dalton [14].

L'électrophorèse capillaire a été appliquée à l'analyse de protéines, de peptides, d'acides aminés et de leurs dérivés dans de nombreux liquides biologiques [15]. La détection fluorimétrique de l'hémoglobine, de la myoglobine et des porphyrines dans l'urine par CZE ou MEKC présente des avantages de rapidité et de faible consommation en réactifs qui en fait une alternative séduisante par rapport aux techniques analytiques clas-

siques [16]. Toutefois, le principal intérêt de l'électrophorèse capillaire se situe au niveau de l'identification de protéines pouvant servir de témoins dans le diagnostic de maladies à partir d'échantillons disponibles en quantité limitée tels que le liquide synovial [17] ou le liquide céphalorachidien [18]. Pour ces mêmes raisons de vitesse d'analyse, de sensibilité et de faible consommation en échantillon, l'électrophorèse capillaire s'avère particulièrement adaptée au couplage avec les techniques de microdialyse en autorisant une réduction du débit de perfusion à un niveau particulièrement faible, d'où une augmentation de la concentration des molécules dans le tampon et une meilleure détection [19].

Par analogie avec les techniques électrophorétiques classiques, l'électrophorèse capillaire a été appliquée à l'analyse des acides nucléiques. La forme la plus employée est la CGE en polyacrylamide qui s'avère plus rapide et plus performante que l'électrophorèse en gel classiquement employée dans les séquenceurs automatiques d'ADN [16] et suscite un grand intérêt pour la purification et le séquençage d'ARN et d'ADN ainsi que pour la recherche de mutations ou d'ADN

viral [20, 21]. Toutefois, pour s'imposer définitivement, la CGE nécessite encore que soit optimisée la stabilité des gels disponibles. De plus, même si la séparation de chromosomes bactériens de 3 à 5 Mb a été réalisée dans des conditions approchant celles de l'électrophorèse capillaire, cette technique reste essentiellement limitée à la séparation de fragments d'ADN d'une taille inférieure à 25 kb.

Sucres et lipides ont aussi fait l'objet d'études afin de déterminer l'intérêt de leur séparation par électrophorèse capillaire. Comme les autres molécules hydrophiles, les monosaccharides et les polysaccharides peuvent être séparés par CZE ou MEKC avec une efficacité dépassant celle des techniques chromatographiques classiques [22]. Une attention particulière a d'ailleurs été accordée à l'héparine pour laquelle, depuis la survenue de l'encéphalopathie spongiforme bovine, des techniques ont été développées afin de contrôler l'origine animale et d'exclure les héparines bovines potentiellement contaminées [23]. Cette identification repose sur la séparation et le dosage par CZE des produits d'hydrolyse enzymatique de l'héparine et sur une analyse statistique des

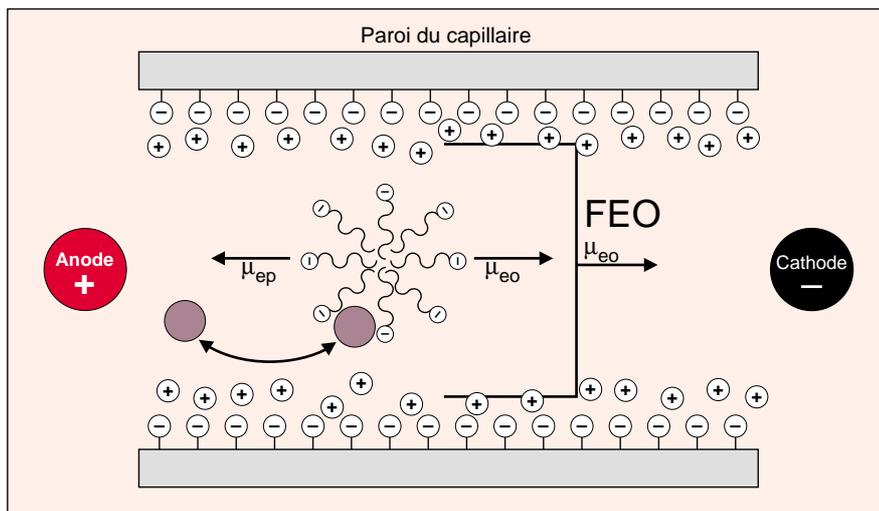


Figure 3. **Principe de séparation des molécules en chromatographie micellaire électrocinétique capillaire (MEKC).** Un tensio-actif ionique est ajouté dans le tampon à une concentration supérieure à sa concentration micellaire critique. Il en résulte la formation de micelles possédant un cœur hydrophobe et une surface chargée. Dans le cas d'un tensio-actif anionique tel que le sodium dodécyl sulfate, ces micelles possèdent une mobilité électrophorétique propre μ_{ep} de sens inverse au FEO et migrent vers la cathode plus lentement que le FEO. Selon leur degré d'hydrophobicité et donc leur coefficient de partage entre le tampon et les micelles, les molécules de l'échantillon sont transportées plus ou moins vite vers la cathode. Les molécules les plus hydrophiles restent essentiellement dans le tampon et migrent avec le FEO alors que les molécules les plus hydrophobes s'associent aux micelles et sont retenues plus longtemps dans le capillaire. Cercles bistres : molécules à séparer et interagissant plus ou moins avec la micelle. Double flèche : mouvement des molécules à séparer entre la micelle et le solvant.

résultats par composants principaux. Le profil de répartition des fragments oligosaccharidiques ainsi obtenu est spécifique de l'origine de l'héparine, et même du tissu dont elle a été extraite. En revanche, l'analyse de lipides par électrophorèse capillaire reste moins employée, en particulier dans le mesure où ces molécules nécessitent de recourir systématiquement à la MEKC ou à la CEC, voire à la NACE.

Détection de molécules exogènes

La liste des agents pharmacologiques, des toxiques, des polluants et des drogues illicites dont l'analyse par CZE ou MEKC dans des échantillons biologiques a été mise au point au cours de ces dernières années est très longue [24, 25]. L'électrophorèse capillaire est d'ailleurs un des outils analytiques les plus fréquemment mis à contribution

dans la recherche des agents dopants et des diurétiques destinés à assurer l'élimination rapide de ces drogues. Ces techniques permettent en particulier de suivre avec précision le métabolisme de molécules présentes à l'état de traces. Il est admis qu'une molécule exogène subit dans l'organisme des réactions de métabolisation qui peuvent être classées en deux, voire trois phases. Les réactions de phase I correspondent à des réactions, essentiellement d'oxydation, d'hydrolyse ou d'isomérisation, qui induisent généralement des modifications structurales trop limitées pour permettre une séparation et une identification satisfaisante par HPLC. Les réactions de phase II sont des réactions de conjugaison qui conduisent à la formation de conjugués fortement polaires et souvent instables dont l'analyse par HPLC est encore plus difficile. Avec son efficacité supérieure et sa vitesse d'analyse, l'électrophorèse capillaire présente

des avantages décisifs sur l'HPLC qui expliquent le rapide développement de son utilisation. De plus, des techniques telles que la MEKC permettent d'envisager l'analyse simultanée des métabolites de phase I et de phase II. Il a ainsi été possible de mettre en évidence des phénomènes de cytotoxicité liés, non seulement à la molécule initialement administrée, mais plus encore à ses métabolites comme dans le cas du cisplatine qui, incubé en présence d'un extrait enzymatique hépatocytaire, engendre sous l'effet d'oxygénases des dérivés dont la toxicité sur des cellules cochléaires s'avère double de celle de la molécule d'origine [26]. Un autre avantage de l'électrophorèse capillaire est la possibilité d'appliquer la MEKC à la séparation et au dosage des stéréo-isomères d'un même produit. Ce type d'approche est déterminant lorsqu'un seul des isomères est porteur de l'activité biologique et qu'on suspecte l'existence de réactions d'isomérisation *in vivo*. Dans cette technique, les micelles de SDS sont remplacées par des micelles chirales, souvent à base de cyclodextrine, qui possèdent une affinité différente pour les formes R(-) et S(+) de la molécule [27].

Étude des interactions récepteur/ligand

Contrairement à la CZE, la CEC ou la CIEF, voire la MEKC, qui peuvent être considérées comme des formes optimisées de techniques classiques, l'ACE combine le principe des techniques de mesure d'affinité avec celui de l'électrophorèse capillaire et a ouvert un champ d'application totalement nouveau. Le fait qu'en électrophorèse capillaire la séparation soit réalisée dans un tampon aqueux permet l'étude des interactions entre ligand et récepteur ou entre antigène et anticorps dans des conditions proches des milieux biologiques, sans pour cela disposer de molécules purifiées puisque parallèlement les composés sont séparés en fonction de leur charge relative. Il est donc possible de travailler avec des molécules peu stables et ne supportant pas une purification poussée. De même on peut envisager l'étude simultanée de

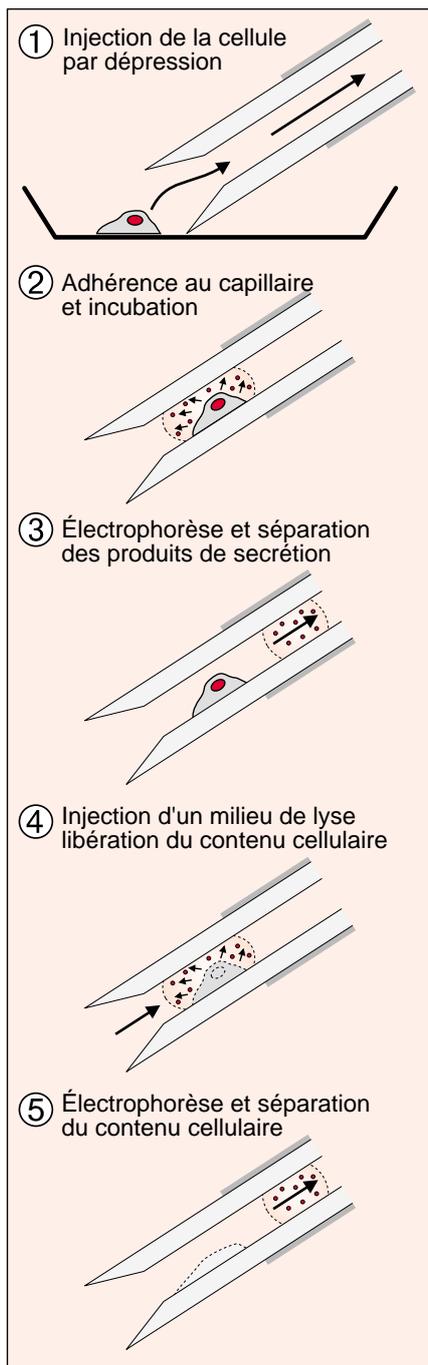


Figure 4. **Principe de l'électrophorèse capillaire sur cellule unique (SC-CE).** Une cellule fraîchement dispersée ou issue d'une culture est aspirée dans un capillaire dont l'entrée a été élargie en cône par un traitement à l'acide fluorhydrique (1). Lorsque la cellule est arrivée à 5 mm de l'entrée du capillaire, l'aspiration est arrêtée. La paroi du capillaire présentant une forte charge électrique, la cellule s'y adsorbe rapidement (10 à 15 mn). Il est possible de vérifier la tenue de la cellule à la paroi du capillaire en faisant refluer quelques microlitres de milieu. La cellule est laissée 5 à 10 minutes dans le milieu de survie à l'intérieur du capillaire afin que ses produits de sécrétion s'accumulent localement (2). Après cette période d'incubation, un champ électrique est imposé entre les deux extrémités du capillaire (3). Le milieu de survie étant aussi le milieu de séparation, les molécules sécrétées sont directement séparées et détectées. L'opération peut être renouvelée un grand nombre de fois en l'absence ou en présence d'un secrétagogue. En fin d'étude, quelques nanolitres d'un milieu de lyse (tampon dilué, sodium dodécyl sulfate, digitonine...) sont aspirés (4). Ce milieu entraîne une lyse de la cellule et la libération de la totalité de son contenu dans le capillaire. Les molécules libérées sont alors séparées comme précédemment (5) afin de déterminer les différences qualitatives et quantitatives entre produits de sécrétion et contenu cellulaire.

différents ligands de structure proche tels que des isoenzymes. A ces avantages décisifs s'ajoute le fait que, comme pour les autres formes d'électrophorèse capillaire, il s'agit d'une microméthode qu'il est possible de mettre en œuvre pour des quantités d'échantillons très limitées.

Le principe de l'ACE repose sur le fait que lorsque deux molécules A et

B peuvent former un complexe AB, si on soumet A à une électrophorèse capillaire en présence de B, la mobilité électrophorétique de A est modifiée d'un facteur $\Delta\mu$ dû à la formation de complexes transitoires avec B. La construction d'un graphe de type Woolf-Hofstee, identique à celui utilisé en enzymologie, représentant $\Delta\mu$ en fonction de $\Delta\mu/[B]$ engendre

une droite dont la pente négative correspond à la constante de dissociation du complexe AB [7]. La constante de dissociation déterminée ainsi s'est avérée d'une précision égale voire supérieure à celle obtenue par d'autres techniques. L'ACE a aussi donné naissance à une technique originale de dosage immunologique. La méthode fait appel à l'utilisation d'un anticorps présent en quantité limitante et à un antigène marqué par un fluorochrome, la détection étant réalisée par fluorescence induite par laser. La réaction entre l'antigène marqué, l'antigène à doser et l'anticorps se déroule directement en solution dans le capillaire. Vu la très haute reproductibilité de l'électrophorèse capillaire et son pouvoir analytique, la réaction peut être réalisée hors équilibre. La séparation des formes liées et libres se faisant au cours de l'électrophorèse, on élimine ainsi les étapes d'incubation et de rinçage. Le dosage immunologique par ACE semble promis à de nombreux développements en raison du gain de temps d'analyse qu'il permet et de sa grande capacité de miniaturisation. Ainsi, une technique de dosage immunologique par ACE, avec des temps de séparation de l'ordre de 25 secondes et capable d'effectuer plus de 1600 dosages en continu avec une sensibilité inférieure à la nanomole, a été mise au point pour la mesure du taux plasmatique d'insuline [28]. En ce qui concerne la miniaturisation de l'ACE, celle-ci a conduit au développement de puces de silice dans lesquelles les capillaires sont remplacés par des microcanaux de quelques millimètres de long réalisés par photolithographie. Cette technique a été en particulier appliquée au dosage du cortisol plasmatique [29]. Dans ces conditions de faible parcours électrophorétique et en appliquant un champ électrique intense (800 V/cm), le temps d'analyse et de dosage du cortisol est réduit à près de 30 secondes contre plusieurs heures, voire jours, par les techniques immunologiques classiques. De plus, il s'agit d'une technique qui ne nécessite pas d'extraction préalable du cortisol, présente une gamme de réponse particulièrement

large et dont la consommation en échantillon, moins de 0,5 nl/dosage, peut être considérée comme négligeable.

Étude sur cellule unique

La SC-CE est la dernière et certainement une des plus spectaculaires évolutions de l'électrophorèse capillaire dans la mesure où cette technique permet pour la première fois d'étudier l'activité sécrétrice de cellules vivantes au niveau unitaire. Les premières formes de la SC-CE ne permettaient pas une mesure dynamique de l'activité cellulaire et étaient très proche de la CZE. Les seules différences reposaient sur le mode de préparation de l'échantillon, obtenu par homogénéisation d'une seule cellule, et sur la technique d'injection de l'extrait cellulaire à l'aide d'une microseringue [30]. Très rapidement, il est apparu qu'il était plus avantageux d'injecter directement la cellule à l'extrémité anodique du capillaire, soit par une microseringue, soit en créant une dépression à l'autre extrémité. La paroi du capillaire étant chargée négativement, la cellule maintenue en survie dans un tampon isotonique s'y adsorbe. Il devient alors possible de libérer son contenu directement dans le capillaire en pompant quelques nanolitres de tampon dilué, de SDS ou de digitonine et de séparer les molécules libérées en imposant un champ électrique entre les deux extrémités du capillaire. L'emploi de solutions de lyse capables d'induire une rupture progressive de la membrane cytoplasmique et des différents organites a permis de mettre en évidence l'existence de différents compartiments de stockage et, associé à des techniques très sensibles de détection électrochimiques ou par spectrométrie de masse, de déterminer le quantum d'un neurotransmetteur tel que la dopamine ou la sérotonine contenu dans un grain de sécrétion [31]. Une séparation électrophorétique peut être réalisée en utilisant un milieu de survie cellulaire dépourvu en albumine car celle-ci tend à s'adsorber sur la paroi du capillaire ce qui annule le FOE. Il devient alors pos-

sible de maintenir en vie la cellule dans le capillaire sur des durées atteignant l'heure et de réaliser une étude dynamique de son activité sécrétrice. Dans cette forme de la SC-CE qui a été appliquée à l'étude de nombreux types cellulaires au nombre desquels des cellules chromaffines médullo-surréaliennes, des cellules β du pancréas, des mastocytes ou des neurones, l'addition d'un sécrétagogue dans le tampon sur une courte période ou pendant toute la durée de l'électrophorèse permet une stimulation ponctuelle ou continue de l'exocytose dont il est possible de reconstruire la cinétique avec une précision inférieure à la seconde (figure 4). En complément, l'introduction en fin d'expérience d'une solution de lyse donne la possibilité de mesurer le contenu de la cellule en neurotransmetteur ou en hormone et de le comparer à la quantité libérée par exocytose au cours de l'étude [32]. Un autre aspect de la SC-CE fait appel à des capillaires de 2 à 5 μ m de diamètre interne disposant d'une extrémité d'une finesse presque comparable à celle d'une pipette d'électrophysiologie avec lesquelles on a à l'origine analysé le contenu cytoplasmique de neurones. L'utilisation de tels capillaires à la façon d'électrodes de *patch-clamp* [33] qui, appliqués sur la membrane cytoplasmique, permettent un dosage en continu de toutes les molécules libérées dans une région limitée, laissent envisager la possibilité d'accéder à une mesure directe des phénomènes exocytotiques au niveau unitaire et, en combinaison avec des techniques fluorimétriques, d'étudier le couplage de l'activité sécrétrice à d'autres processus tels que les flux ioniques, l'activation d'autorécepteurs ou la mobilisation des éléments du cytosquelette [11].

Les applications bio-médicales de l'électrophorèse capillaire n'en sont encore qu'à leurs débuts. A côté des atouts de cette technique analytique en terme d'efficacité, de rapidité, de souplesse d'utilisation, de sensibilité, et de capacité de miniaturisation, l'électrophorèse capillaire permet d'entrevoir le développement d'une forme de *patch-clamp* chimique qui à l'image de son précurseur pourrait

révolutionner dans les prochaines années notre approche de la physiologie cellulaire par un accès direct aux cinétiques chimiques au sein de la cellule vivante ■

RÉFÉRENCES

1. Monning CA, Kennedy RT. Capillary electrophoresis. *Ann Chem* 1994; 66: 280R-314R.
2. Fazio S, Vivilecchia R, Lesueur L, Sheridan J. Capillary zone electrophoresis: some promising pharmaceutical applications. *J Am Biotechnol Lab* 1990; 8: 10-22.
3. Dong M, Ding XQ, Pinon DI, et al. Structurally related peptide agonist, partial agonist, and antagonist occupy a similar binding pocket within the cholecystokinin receptor. Rapid analysis using fluorescent photoaffinity labeling probes and capillary electrophoresis. *J Biol Chem* 1999; 274: 4778-85.
4. Otsuka K, Terabe S. Micellar electrokinetic chromatography. *Mol Biotechnol* 1998; 9: 253-71.
5. Pritchett TJ. Capillary isoelectric focusing of proteins. *Electrophoresis* 1996; 17: 1195-201.
6. Karger BL, Foret F, Berka J. Capillary electrophoresis with polymer matrices: DNA and protein separation and analysis. *Meth Enzymol* 1996; 271: 293-319.
7. Shimura K, Kasai K. Affinity capillary electrophoresis: a sensitive tool for the study of molecular interactions and its use in microscale analyses. *Ann Biochem* 1997; 251: 1-16.
8. Colon LA, Reynolds KJ, Alicea-Maldonado R, Fermier AM. Advances in capillary electrochromatography. *Electrophoresis* 1997; 18: 2162-74.
9. Krivankova L, Gebauer P, Bocek P. Isotachophoresis. *Meth Enzymol* 1996; 270: 342-58.
10. Bjornsdottir I, Tjornelund J, Hansen SH. Nonaqueous capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. *J Capillary Electrophor* 1996; 3: 83-7.
11. Chen G, Ewing AG. Chemical analysis of single cells and exocytosis. *Crit Rev Neurobiol* 1997; 11: 59-90.
12. Wijnen PAHM, Van Diejen-Visser MP. Capillary electrophoresis of serum proteins. Reproducibility, comparison with agarose gel electrophoresis and a review of the literature. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996; 34: 535-45.
13. Jenkins MA, Guerin MD. Capillary electrophoresis as a clinical tool. *J Chromatogr B* 1996; 682: 23-34.
14. Valaskovic GA, Kelleher NL, McLafferty FW. Atomomic protein characterization by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Science* 1996; 273: 1199-202.

RÉFÉRENCES

15. Park SS, Hung WL, Schaufelberger DE, Guzman NA, Advis JP. Determination of neuropeptides by capillary electrophoresis. *Meth Mol Biol* 1997; 73: 101-11.
16. Landers JP. Clinical capillary electrophoresis. *Clin Chem* 1995; 41: 495-509.
17. Sharif M, Osborne DJ, Meadows K, et al. The relevance of chondroitin and keratan sulphate markers in normal and arthritic synovial fluid. *Br J Rheumatol* 1996; 35: 951-7.
18. Hiraoka A, Arato T, Tominaga I, Eguchi N, Oda H, Urade Y. Sodium dodecyl sulfate-capillary gel electrophoretic analysis of molecular mass microheterogeneity of β -trace protein in cerebrospinal fluid from patients with central nervous system diseases. *J Chromatogr A* 1998; 802: 143-8.
19. Lada MW, Kennedy RT. *In vivo* monitoring of glutathione and cysteine in rat caudate nucleus using microdialysis on-line with capillary zone electrophoresis-laser induced fluorescence detection. *J Neurosci Meth* 1997; 72: 153-9.
20. Salas-Solano O, Carrilho E, Kotler L, et al. Routine DNA sequencing of 1000 bases in less than one hour by capillary electrophoresis with replaceable linear polyacrylamide solutions. *Ann Chem* 1998; 70: 3996-4003.
21. Skeidsvoll J, Ueland PM. Analysis of RNA by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 1996; 17: 1512-7.
22. El Rassi Z. Recent developments in capillary electrophoresis of carbohydrate species. *Electrophoresis* 1997; 18: 2400-7.
23. Grimshaw J. Analysis of glycosaminoglycans and their oligosaccharide fragments by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 1997; 18: 2408-14.
24. Thormann W, Zhang CX, Schmutz A. Capillary electrophoresis for drug analysis in body fluids. *Ther Drug Monit* 1996; 18: 506-20.
25. Naylor S, Benson LM, Tomlinson AJ. Application of capillary electrophoresis and related techniques to drug metabolite studies. *J Chromatogr A* 1996; 735: 415-38.
26. Saito T, Yamada T, Manabe Y, Yamamoto T, Saito H. Cisplatin metabolites and their toxicity on isolated cochlear outer hair cells *in vitro*. *Acta Otolaryngol* 1996; 116: 561-5.
27. Fillet M, Hubert P, Crommen J. Method development strategies for the enantioseparation of drugs by capillary electrophoresis using cyclodextrins as chiral additives. *Electrophoresis* 1998; 19: 2834-40.
28. Tao L, Kennedy RT. On-line competitive immunoassay for insulin based on capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Ann Chem* 1996; 68: 3899-906.
29. Koutny LB, Schmalzing D, Taylor TA, Fuchs M. Microchip electrophoretic immunoassay for serum cortisol. *Ann Chem* 1996; 68: 18-22.
30. Kennedy RT, Oates MD, Cooper BR, Nickerson B, Jorgenson JW. Microcolumn separations and the analysis of single cells. *Science* 1989; 246: 57-63.
31. Clark RA, Ewing AG. Quantitative measurements of released amines from individual exocytotic events. *Mol Neurobiol* 1997; 15: 1-16.
32. Yeung ES. Study of single cells by using capillary electrophoresis and native fluorescence detection. *J Chromatogr A* 1999; 830: 243-62.
33. Sauvé R. Le *patch clamp*: une nouvelle façon de voir les canaux ioniques. *Med Sci* 1987; 3: 538-45.

Marc G.J. Feuilloley
Annabelle Merieau
Nicole Orange

Laboratoire de Microbiologie du Froid, UPRES 2123, Université de Rouen, IUT d'Évreux, 55, rue Saint-Germain, 27000 Évreux, France.

Summary

Bio-medical applications of capillary electrophoresis

Capillary electrophoresis is a recently developed microtechnique for the qualitative and quantitative analysis of complex biological samples. In capillary electrophoresis, molecules are injected in a capillary tube, eventually filled with a bonded silica matrix. Separation of the molecules is achieved by setting a strong electric potential, reaching 500V/cm, between the two ends of the capillary. Such a strong electric potential requires the use of low diameter capillary tubes in order to dissipate the heat generated by the Joule effect. By this technique it is possible to separate very rapidly, with an exceptional efficiency and over a very large range of molecular weights different types of molecules including carbohydrates, lipids, peptides, proteins and ions. For binding studies or immunoassay certain forms of capillary electrophoresis also appear much more efficient and rapid than the classical techniques. However, the most recent and also the most innovative aspects of capillary electrophoresis resides in its use for the study of the intracellular and secretory activity of one living cell which gave birth to single cell-capillary electrophoresis that we can present as an original form of « chemical patch-clamp ».

TIRÉS À PART

M.G.J. Feuilloley.